

βD-галактопиранозид-2-СНА), MbDG (метил-βD-глюкопиранозид), RAF (D-раффиноза), HIP (натрия гиппурат), aGAL (4-нитрофенил-αD-галактопиранозид), RIB (D-рибоза), MAN (D-маннит), bGLU (резорифин-βD-глюкопиранозид), MEL (D-мелибиоза), VP (натрия пируват), CDEX (α-циклодекстрин), PUL (пуллулан), ADH (L-аргинин), TRE (D-трегалоза), PYRA (пироглютаминат-β-нафтиламид), LAC (D-лактоза), LARA (L-арабиноза), bGUR (резорифин-βD-глюкуронид), SAC (D-сахароза), MAL (D-мальтоза), MLZ (D-мелицитоза).

Литература:

1. Разработка программного обеспечения для автоматического учета тест-систем с целью идентификации стрептококков / В. К. Окулич [и др.] // Современ. проблемы инфекц. патологии человека : сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Бел., РНПЦ эпидемиологии и микробиологии ; под. ред.: Л. П. Титова. – Минск : ГУ РНМБ, 2017. – Вып. 10. – С. 178–182.

2. Шилин, В. Е. Тест-системы «ИД-энтер» и «АБ-грам (-)» для определения этиологической роли грамотрицательных микроорганизмов и спектра их резистентности к антибиотикам при синдроме диабетической стопы / В. Е. Шилин, В. К. Окулич, В. П. Булавкин // Вестн. ВГМУ. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 30–36.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

**Семенов В.М., Дмитраченко Т.И., Редненко А.В., Щигун Н.В.,
Марченко А.А.**

УО «Витебский государственный медицинский университет»

Парвовирусы являются к одним из самых мелких вирусов (от латинского *parvum* – маленький), широко распространены в природе. В самостоятельное семейство они были выделены в 1973 г. и в настоящее время известно более 50 вирусов, патогенных для млекопитающих, птиц и насекомых [1]. В 1974 г. Y. Cossat в Лондоне описал патогенный для человека парвовирус B19, вызывающий инфекционную эритему. Позднее в 1981-83 гг. J. Pattison установил этиологическую роль парвовируса B19 при апластическом кризе у детей с анемией, а в 1985 г. в Великобритании была выявлена связь между этим вирусом и развитием артропатий [1,2].

Парвовирусы относятся к простым безоболочечным вирусам размерами 18-26 нм. Геном представлен линейной одноцепочной ДНК, причем у вируса B19 в разных вирионах может быть либо позитивная цепь ДНК, либо негативная. Обе цепи комплементарны друг другу и *in vitro* могут образовывать двухспиральную ДНК. Небольшой размер генома ($4-6 \times 10^3$ п.о.) позволяет этим вирусам репродуцироваться только в быстро делящихся клетках. Клетками-мишенями для вируса B19 являются клетки-

предшественники гемопоэза, находящиеся в красном костном мозге и селезенке, и гепатоциты плода, которые под воздействием вируса лизируются. Поэтому во время вирусемии наблюдается падение уровня ретикулоцитов вплоть до их полного исчезновения, предшествующее падению уровня эритроцитов и гемоглобина. Также может наблюдаться временное падение уровня лимфоцитов, гранулоцитов, тромбоцитов. Интересно, что рецептором для парвовируса В19 является групповой антиген крови Р, и лица, у которых отсутствует антиген, являются невосприимчивыми к этой инфекции [1, 3].

Присутствие парвовируса В19 может очень длительное время (до года) фиксироваться в крови прямыми и косвенными методами. В острой фазе вирусемия в крови может достигать высоких значений – до 1012 ГЭ/мл. Антитела класса IgM к парвовирусу В19 у здоровых людей могут пропадать сравнительно быстро, но могут обнаруживаться в плазме на низких титрах до полугода [2, 3]. Использование серологического анализа во время беременности имеет ряд особенностей. Титр специфических антител класса IgM в крови матери может опускаться до неопределяемых значений к моменту появления симптомов у плода, а образование антител класса IgG может при этом запаздывать. У плода и новорожденных, заражение которых произошло в первые 14 недель гестации, что подтверждалось определением ДНК парвовируса В19 методом ПЦР, антитела класса IgM в пуповинной крови обнаруживаются редко (в ~22% случаев). Однако, при инфицировании плода в последнем триместре беременности, IgM антитела детектируются в 100% случаев. Антитела класса IgM появляются в середине беременности, что делает диагностические тесты на определение IgM антител у плода менее чувствительными. При заражении плода до этого момента вероятность выработки специфических IgM антител минимальна, что объясняется неразвитым иммунитетом плода, а также подавлением выработки вирусспецифических IgM антител в связи с циркуляцией пассивно полученных материнских антител [3, 4]. В связи с тем что парвовирус В19 не способен эффективно реплицироваться в стандартных линиях культур клеток, широкое использование вирусологического метода диагностики данного агента ограничено. Таким образом, определение вирусной ДНК методом ПЦР в клиническом материале служит наиболее достоверным инструментом диагностики парвовирусной инфекции.

Цель исследования – создание тест-системы для обнаружения парвовируса В19 методом ПЦР в режиме реального времени и оценка ее специфичности и чувствительности

Материал и методы. С целью создания молекулярно-генетической тест-системы в банке аннотированных нуклеотидных последовательностей GenBank Национального Центра Биотехнологической Информации США (GenBank NCBI USA) производили поиск нуклеотидных последовательностей искомых генов. Проводили проверку выбранных последовательностей праймеров на специфичность отжига (фактически на

сродство), т.к. праймеры, даже абсолютно уникальные для тех или иных последовательностей ДНК парвовируса В19, могут отжигаться и на неспецифичных участках, не относящихся к анализируемому гену.

Последовательность зонда подбирали таким образом, чтобы он отжигался на матрицу между прямым и обратным праймерами. Он представляет собой олигонуклеотид, к которому присоединены молекула флуорофора и молекула гасителя флуоресценции. Все синтезируемые зонды проходили высокоэффективную очистку

Готовили лиофилизированную смесь реагентов, содержащую специфические праймеры парвовируса В19, ДНК-зонды, смесь дезоксирибонуклеотидов, а также олигонуклеотиды.

Использовали фермент Таq-полимераза (5 Ед/мкл), концентрат пассивного референсного красителя ROX, концентрат ПЦР-буфера, содержащий хлорид магния.

Для выделения ДНК парвовируса В19 был разработан колоночный метод.

Результаты и обсуждение. Проведенный анализ показал, что созданная тест-система может применяться для качественного и количественного определения ДНК парвовируса В19) в сыворотке, плазме, амниотической или синовиальной жидкости в режиме реального времени.

Анализ чувствительности и специфичности созданной тест-системы представлен в таблице и рисунке.

Представленные в таблице данные показывают высокую степень чувствительности и специфичности разработанной нами тест-системы для обнаружения ДНК парвовируса В19 методом ПЦР в режиме реального времени.

Таблица. Характеристика тест-системы для обнаружения ДНК парвовируса В19

Характеристики	Образец	Производительность
Аналитическая чувствительность	Синтетическая ДНК PVB19	≥10 копий за пробег
Линейный диапазон	Синтетическая ДНК PVB19	>6 логарифмов
Распознавание генотипов	Референсные образцы (n 11)	1 2 3a 3b
Аналитическая специфичность	PVB19 негативные образцы (n 48)	100%
Диагностическая специфичность	PVB19 негативная плазма (n 96)	100%

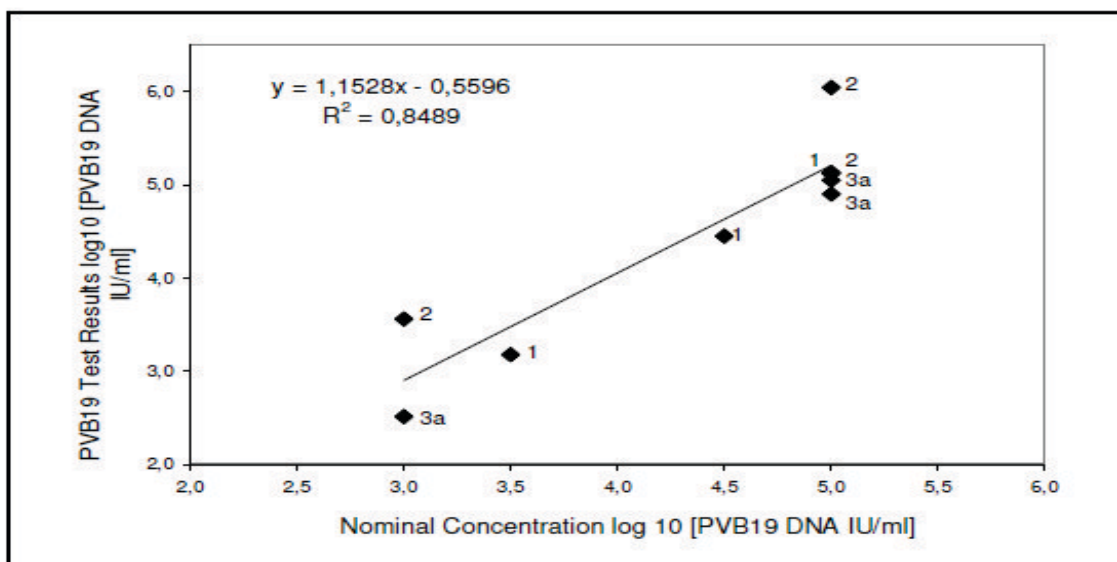


Рисунок. Специфичность тест-системы для обнаружения ДНК парвовируса В19.

Выводы

Разработанная тест-система может быть использована в практическом здравоохранении для диагностики и оценки эффективности лечения при парвовирусной инфекции.

Литература:

1. Heegaard, E. D. Parvovirus B19 / E. D. Heegaard, K. E. Brown Human // Clinical Microbiology Reviews. – 2002. – Vol. 15, № 3. – P. 485–505.
2. Katta, R. Parvovirus B19: a review / R. Katta // Dermatol Clin. – 2002. – № 20. – P. 333–342.
3. Young, N. S. Parvovirus B19 / N. S. Young, K. E. Brown // N Engl J Med. 2004. – № 350. – P. 586–597.
4. American College of Obstetrics and Gynecologists. ACOG practice bulletin. Perinatal viral and parasitic infections // Int J Gynaecol Obstet. – 2002. – № 76. – P. 95–107.

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ С ГИБРИДИЗАЦИОННО- ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

*Семенов В.М., Дмитраченко Т.И., Акулич Н.Ф., Шпигун Н.В.,
Зенькова С.К., Горбачев В.В.*

УО «Витебский государственный медицинский университет»

Цитомегаловирус (ЦМВ) – один из наиболее часто встречающихся вирусов, имеет способность к быстрому росту, размножению и длительной персистенции в организме человека, сохраняется в лимфоцитах. ЦМВ